

# AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* E Auto-Anticorpos em Doentes com Doença Inflamatória Intestinal

Marília BELTRÃO, Abília BODAS, Fernando AZEVEDO, Amadeu NUNES,  
Carlos SANTOS, Luís DELGADO

## RESUMO

Nas últimas décadas a incidência das doenças inflamatórias intestinais (DII) tem aumentado a nível mundial, pelo que o seu diagnóstico se tornou um tópico de interesse crescente na prática clínica. Apesar dos avanços no conhecimento da patogénese e terapêuticas o diagnóstico diferencial entre doença de Crohn (DC) e Colite ulcerosa (CU) continua a ter como base clínica testes invasivos,

Estudos recentes identificaram novos marcadores serológicos promissores para o diagnóstico destas patologias, com destaque para os anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) e anti-citoplasma dos neutrófilos (ANCA). Também têm merecido atenção os anticorpos anti-células caliciformes intestinais (anti-CCI) e os anti-secreções exócrinas pancreáticas, que reagem com ácinos pancreáticos (anti-AP).

Neste estudo avaliámos estes novos marcadores serológicos e comparámos a eficiência dos ensaios imuno-enzimático (ELISA) e de imunofluorescência indirecta (IFA) na pesquisa de ASCA de classe IgG/IgA. Incluímos 81 amostras de soro de doentes seguidos em consulta externa de Gastrenterologia (com o diagnóstico de entrada no laboratório de doença inflamatória intestinal), bem como 33 amostras de controlo, provenientes de indivíduos saudáveis, dadores de sangue.

Os resultados laboratoriais obtidos foram relacionados com o diagnóstico de cada doente estabelecido por critérios clínicos e histopatológicos na consulta externa de Gastrenterologia. A concordância entre os dois métodos laboratoriais utilizados para a pesquisa do marcador ASCA foi excelente ( $k = 0,63$ ) para os anticorpos da classe IgG e boa ( $k = 0,56$ ) para os anticorpos da classe IgA. Verificámos uma fraca concordância ( $k = 0,137$ ) entre o método ELISA (MPO ou PR3 purificadas) e o método IFA para pesquisa de ANCA. Relativamente aos marcadores estudados ANCA, anti-AP e anti-CCI apenas este último não demonstrou diferenças de distribuição da positividade entre grupos, pelo que nos permite concluir que na nossa casuística não auxilia na diferenciação serológica das DII.

Verificámos, que a positividade do marcador ASCA se associa significativamente ao diagnóstico de DC, quer para os ASCA IgG quer IgA e para os dois métodos laboratoriais estudados. A pesquisa de ANCA pelos ensaios de fase-sólida disponíveis não parece adequada para o *screening* dos autoanticorpos com o padrão p-ANCA atípico das DII. A combinação entre os marcadores anti-AP e ASCA, parece uma boa opção para o diagnóstico laboratorial da DC.

Este estudo mostra que estes marcadores serológicos tendo o mérito de não serem testes invasivos, apresentam uma sobreposição considerável nas diferentes DII. Contudo estu-

M.B., A.B., L.D.: Serviço e Laboratório de Imunologia. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Porto.  
F.A., A.N., C.S.: Serviço de Gastrenterologia. Hospital São João. Porto.

© 2010 CELOM

dos prospectivos e em populações mais alargadas são necessários para clarificar a relação entre estes anticorpos, o diagnóstico e a evolução clínica da Doença Inflamatória Intestinal.

## SUMMARY

### ASSESSMENT OF ANTIBODIES ANTI-SACCHAROMYCES CEREVISIAE (ASCA) AND AUTOANTIBODIES

#### In Patients with Inflammatory Bowel Disease

The incidence of inflammatory bowel disease (IBD) has been increasing worldwide, and despite the advances regarding their pathogenesis and therapeutics, the differential diagnosis between Crohn's Disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC) is mainly based on clinically invasive tests.

Recent studies have identified new serological markers with a potential value for the diagnosis of these pathologies, in particular the anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). Also of note are the anti-goblet cells antibodies (anti-CCI) and the anti-pancreatic exocrine autoantibodies that react with the pancreatic acinus (anti-AP).

We assessed these new serological markers and compared the efficiency between immune enzymatic (ELISA) and indirect immunofluorescence tests in the identification of ASCA of IgG or IgA class. We studied a set of 81 serum samples (with an initial diagnosis of IBD) and 33 control samples from healthy blood donors.

The laboratory tests were correlated with the diagnosis of each patient, established in the Gastroenterology outpatient unit based on conventional methods. The agreement between the two laboratory methods employed in the identification of the ASCA was excellent ( $k = 0.63$ ) for the IgG antibodies and good ( $k = 0.56$ ) for the IgA antibodies. We found a weak agreement ( $k = 0.137$ ) between ELISA (MPO and PR3 purified antigens) and the IFA test for ANCA. Regarding the serologic markers ANCA, anti-AP and anti-CCI, only the later showed no differences in the distribution of positive results between the studied groups.

Positive ASCA IgG and IgA were significantly associated with diagnosis of DC, with both laboratorial methods tested. The identification of ANCA with the available solid-phase tests does not seem appropriate for the screening of the autoantibodies with the atypical p-ANCA pattern of IBD. The combination between anti-AP and ASCA antibodies seems a good option for the laboratorial diagnosis of CD.

This study shows that these serologic markers in spite of being non invasive laboratory tests, also have a considerable overlapping in the different IBD. Nevertheless, further prospective studies based on larger populations are required to clarify the relationship between these antibodies, the diagnosis and clinical evolution of inflammatory bowel disease.

## INTRODUÇÃO

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) são doenças crónicas que envolvem predominantemente o aparelho digestivo e cuja etiopatogenia continua incompletamente elucidada<sup>1,2</sup>. As DII incluem a Colite Ulcerosa (CU) e a Doença de Crohn (DC), duas entidades clínicas cujo diagnóstico se baseia numa constelação de dados clínicos, radiográficos, laboratoriais e histopatológicos<sup>2-4</sup>.

A inflamação na DC ocorre caracteristicamente na parte distal do intestino delgado (podendo no entanto afectar qualquer segmento digestivo entre a boca e ânus), de forma assimétrica e segmentar, i.e. com áreas inflamadas intervaladas de tecido normal. Em contraste, na CU a inflamação encontra-se limitada à mucosa e submucosa superficial do intestino, envolvendo geralmente o recto (na DC o recto é um segmento geralmente preservado) e estendendo-se em direcção proximal, afectando parte ou todo o

intestino grosso. Nem sempre a diferenciação entre estas doenças é possível, pelo que cerca de 10% dos casos podem ser mal classificados e outros 10% são diagnosticados como colite não classificada<sup>5,6</sup>.

A hipótese da intervenção de mecanismos imunológicos na génese destas doenças é colocada há vários anos<sup>7</sup> e sobretudo sugerida pela histopatologia das lesões (agregados linfóides na submucosa, abscessos focais com infiltrados de macrófagos), pelo tipo de complicações extra intestinais (eritema nodoso, artrite periférica, episclerite), pela presença de determinados auto-anticorpos no soro dos doentes e pela resposta aos agentes imunomoduladores<sup>2,3</sup>.

Vários marcadores serológicos têm sido utilizados para diferenciar a DC da CU, podendo ser detectados no soro dos doentes com DII anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) e anti-citoplasma dos neutrófilos (ANCA)<sup>2</sup>. Também têm merecido atenção os anticorpos anti-células caliciformes intestinais (anti-CCI) e os anti-secreções exócrinas pancreáticas, que reagem com ácidos pancreáticos (anti-AP)<sup>3</sup>.

Os ASCA são imunoglobulinas de classe IgG ou IgA direccionadas contra as sequências de manose na parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*<sup>3,8,9</sup>. Estes anticorpos estão descritos como mais prevalentes na doença de Crohn, geralmente acima de 65% dos doentes<sup>8,10,11</sup>.

Os ANCA são imunoglobulinas predominantemente da classe IgG que reagem com as enzimas dos grânulos primários dos neutrófilos e lisossomas de monócitos<sup>1</sup>. A CU está associada a um grupo particular de anticorpos anti-citoplasma dos neutrófilos, com reactividade perinuclear na imunofluorescência indirecta, e podem ser encontrados entre 40 a 80% dos indivíduos com CU e em 5-10% dos indivíduos com DC<sup>2,12</sup>. Os antígenos que reconhecem esses auto-anticorpos ainda não foram identificados com clareza, mas são diferentes dos que estão associados às vasculites e poderão ser um marcador da reactividade às bactérias entéricas<sup>2,13,14</sup>.

Os auto-anticorpos pancreáticos (anti-AP), que reagem com antígenos ainda não identificados mas presentes no suco pancreático, poderão ser encontrados em cerca de 30 a 40% dos doentes com DC. Em contraste, os anticorpos anti-CCI têm sido associados à CU, mas presentes em cerca de 30% dos doentes<sup>5</sup>.

Este estudo tem como objectivo: i) comparar duas metodologias laboratoriais na pesquisa de ASCA (método imuno-enzimático, ELISA e de imunofluorescência indirecta, IFA); ii) avaliar a distribuição destes novos marcadores serológicos (ASCA, ANCA, anti-CCI e anti-AP), em amostras séricas de doentes com doença inflamatória intestinal enviadas ao laboratório para pesquisa de ANCA.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostra

Estudamos um total de 81 amostras de soro, das quais 48 enviadas para pesquisa de ANCA, de doentes seguidos em consulta externa de Gastrenterologia, (com o diagnóstico de entrada no laboratório de doença inflamatória intestinal), bem como 33 amostras controlo de indivíduos saudáveis, dadores de sangue. As amostras, colhidas em sistema de vácuo Becton-Dickinson Vacutainer®, foram centrifugadas, separadas em alíquotas e congeladas a -20°C.

## MÉTODOS

### Detecção dos anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) por ensaio imunoenzimático

Foram utilizados ensaios imunoenzimáticos (ELISA), *QUANTA Lite™* (Inova Diagnostics, USA) ASCA, para a detecção semi-quantitativa de anticorpos IgG e IgA anti-*Saccharomyces cerevisiae*. O antígeno em fase sólida, presente no revestimento dos poços da placa de poliestireno, está identificado pelo fabricante como sendo parcialmente purificado da parede celular do *Saccharomyces cerevisiae*.

A técnica foi realizada, de acordo com as instruções do fabricante, e a leitura óptica é feita a 450 nm, utilizando um autoanalisador de microELISA MAGO® PLUS, Diamedix® (ISODER, SA)

Os resultados são expressos em unidades arbitrárias e considerados positivos para valores  $\geq 25$  U/ml. Os resultados entre 20,1 e 24,9 (que podem ser considerados ambíguos) foram considerados negativos para a análise estatística.

A relação entre a reactividade e a quantidade de anticorpos presentes é não linear. Apesar de o aumento ou a diminuição das concentrações de anticorpos no doente se reflectirem num correspondente aumento ou diminuição da reactividade, a alteração não é proporcional (ou seja, a duplicação da concentração de anticorpos não duplica a reactividade).

### Detecção de auto-anticorpos por Imunofluorescência Indirecta

Os anticorpos IgG e IgA ASCA, os IgG ANCA e IgG anti-CCI e anti-AP foram igualmente determinados por imunofluorescência indirecta usando a lâmina *BIOCHIP Mosaic™* (EUROIMMUN, Germany), com quatro tipos de substratos: secções de tecido de pâncreas exócrino e de intestino de primata, granulócitos humanos e a levedura *S. cerevisiae*. Com este método é em princípio possível

fazer a detecção e titulação simultânea dos diferentes anticorpos.

As amostras foram diluídas (1:10 a 1:1000) com solução salina de tampão fosfato (PBS-Tween).

As lâminas foram observadas num microscópio LABOPHOT-2 (Nikon EFD-3), comparando as amostras de controlo positivo e negativo, pelo mesmo observador e sem conhecimento prévio do diagnóstico.

Relativamente ao substrato *S. cerevisiae* foram consideradas positivas, quanto à presença de anticorpos da classe IgG ou IgA, as amostras com títulos iguais ou superiores a 1/1000 e 1/100 e de acordo com as instruções do fabricante. Para os restantes substratos, foram consideradas positivas as amostras com títulos iguais ou superiores a 1/10.

#### **Detecção dos anticorpos anti-citoplasma dos neutrófilos (ANCA) por ensaio imunoenzimático**

A determinação semi-quantitativa de anticorpos da classe IgG anti-mieloperoxidase (MPO) e anti-proteinase 3 (PR3), foi igualmente realizada recorrendo aos ensaios imunoenzimáticos (ELISA) *QUANTA Lite™ MPO* e *QUANTA Lite™ PR3*, (Inova Diagnostics, USA), utilizando na fase sólida antígenos humanos purificados de MPO e PR3, respectivamente. A técnica foi realizada de acordo com as instruções do fabricante e recorrendo ao autoanalisador acima referido.

Os resultados foram expressos sob a forma numérica (unidades arbitrárias) sendo as reactividades encontradas entre 21 e 30 U/ml consideradas fracamente positivas e acima de 30U/ml moderada a fortemente positiva. Na análise estatística os resultados foram considerados positivos para valores  $\geq 21$ U/ml.

#### **Análise Estatística**

Foram utilizados os testes do Qui-Quadrado e de *t-student* para duas amostras independentes para averiguar se existiam diferenças significativas entre a população de estudo e a de controlo respectivamente quanto ao sexo e idade. A análise dos resultados entre grupos patológicos foi feita com base no diagnóstico estabelecido por critérios clínicos e histopatológicos na consulta externa de Gastroenterologia<sup>4</sup>. A normalidade da distribuição foi avaliada com o teste Kolmogorov-Smirnov.

Utilizou-se o teste do Qui-Quadrado ou o teste exacto de Fisher para a comparação de proporções. Consideraram-se diferenças a um nível de significância de 0,05.

Como secundariamente, se pretendeu comparar o ensaio imuno-enzimático (ELISA) e de imunofluorescência indirecta (IFA) na pesquisa de ASCA, foram traçadas curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) que permiti-

ram estudar a variação da sensibilidade e especificidade, para diferentes valores de corte. A magnitude da concordância entre os dois métodos usados na determinação dos anticorpos ASCA foi feita pela estatística K. A concordância medida pelo kappa foi considerada perfeita para 1,00; fraca entre 0-0,2; moderada entre 0,2-0,4; boa entre 0,4-0,6 e excelente para valores iguais ou superiores a 0,6<sup>15</sup>.

#### **RESULTADOS**

Das amostras patológicas estudadas, 28 pertenciam a indivíduos com o diagnóstico de doença de Crohn, com uma média de idades 42 anos (14-69 anos) sendo 64% do sexo feminino; 20 de indivíduos com o diagnóstico de colite ulcerosa, média de idades 39 anos (18-66 anos), 60 % do sexo feminino.

O grupo controlo tinha uma média de idades 43 anos (19- 62 anos) sendo 66% do sexo feminino.

Não encontramos diferenças significativas na distribuição de sexo e idades entre os diferentes grupos estudados.

#### **Anticorpos Anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA)**

As amostras foram consideradas positivas para o marcador ASCA quando apresentaram reactividade para ambos ou apenas um dos conjugados. Com método ELISA obteve-se resultados positivos em 14 indivíduos com DC (50%), dos quais dez eram positivos para os conjugados IgG e IgA e quatro apenas para IgG.

Por IFA obteve-se reactividade em 16 indivíduos (57%) com DC, dos quais quatro eram positivos para IgG e IgA, cinco para IgG e apenas três para IgA.

Nos indivíduos com CU foi encontrada reactividade em duas amostras para IgG, das quais uma para ambos os métodos e a outra apenas no ELISA ASCA IgA. No grupo controlo foram encontradas igualmente duas amostras reactivas no método ELISA, uma para IgA e outra para IgG.

Há diferenças de distribuição nos resultados positivos no grupo com DC em relação ao grupo com CU e aos controlos, quer para os ASCA IgG quer IgA e para os dois métodos laboratoriais avaliados.

Para o valor de corte de referência (25 U/ml) os dois métodos foram concordantes em dez dos 11 casos que apresentavam reactividade para IgG e em 62 dos 70 casos negativos (89%). Na reactividade a IgA foram concordantes em seis dos sete casos positivos e em 67 dos 74 casos não reactivos (91%). O valor k demonstrou a existência de uma excelente concordância entre dois métodos (ELISA/IFA) para IgG (k = 0,63) e boa concordância para IgA (k = 0,56), com um  $p < 0,01$  (Quadro 1).

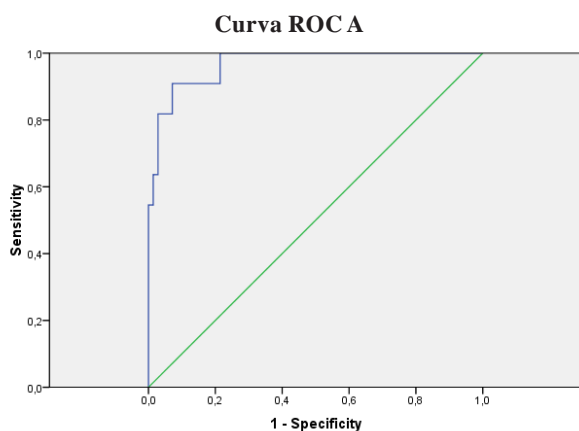
Quadro 1 – Comparação do ensaio imuno-enzimático (ELISA) e de imunofluorescência indirecta na pesquisa de anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) em 81 amostras de soro. Foram traçadas curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) para estudar a variação da sensibilidade e especificidade, em diferentes valores de corte (cut-value) dos resultados ELISA, para IgG e IgA ASCA

	IgG ASCA		IgA ASCA	
	cut-off	cut-value	cut-off	cut-value
	25 U/ml*	28 U/ml	25 u/ml*	190 U/ml
Sensibilidade	91,7	91,7	87,0	87,5
Especificidade	88,0	92,0	89,9	98,7
Kappa **	0,63	0,46	0,56	0,86

\* Valor de referência para positividade no método ELISA, segundo o fabricante.

\*\* Magnitude de concordância entre métodos ELISA/IFA pela estatística K.

Os resultados obtidos com o ensaio imuno-enzimáticos para cada um dos isotipos (IgG ou IgA) foram utilizados para gerar curvas ROC (Figura 1). Com base nas curvas ROC, verificou-se que, para a IgG, um valor de corte de 28U/ml aumentava a especificidade de 88% para 92% mantendo a sensibilidade, mas baixava a concordância ( $k = 0,46$ ). Para a IgA, um valor de corte de 190 U/ml traduzia num aumento da especificidade de 88% para 99%, com aumento da concordância ( $k$  de 0,56 para 0,86) (Quadro 1). Com este novo ponto de corte o número de amostras discrepantes (ELISA +/IFA -) entre os dois métodos diminuiu de sete para um.



## Outros auto-anticorpos detectados por imunofluorescência indirecta (Quadro 2)

Quadro 2 – Percentagem de positividade dos diferentes marcadores nos três grupos estudados. Para os ASCA a distribuição de resultados positivos é significativamente diferente entre a Doença de Crohn a Colite Ulcerosa e grupo Controlo quer para os anticorpos IgG ( $\chi^2 = 13,94$ ,  $p = 0,001$ ), quer para os anticorpos IgA ( $\chi^2 = 10,13$ ,  $p = 0,006$ )

Métodos	Marcadores serológicos	Colite Ulcerosa	Doença de Crohn	Controlos
		(n = 20)	(n = 28)	(n = 33)
ELISA	ASCA (IgG ou IgA)	10 %	50 %	3 %
	ANCA	35 %	14 %	6 %
IFA	Anti -CCI	30 %	14 %	12 %
	Anti -AP	5 %	21 %	3 %

ELISA (Imuno-enzimático); IFA (Imunofluorescência indirecta); ASCA (Anticorpos Anti-*Saccharomyces cerevisiae*); ANCA (Anticorpos Anti-citoplasma dos neutrófilos); Anti CCI (Anticorpos Anti-células caliciformes) e Anti-AP (Anticorpos Anti-ácinos pancreáticos)

## Anticorpos anti-citoplasma dos neutrófilos (ANCA)

Os ANCA (pesquisados por IFA em neutrófilos fixados pelo etanol) foram positivos em sete doentes com CU (35%) e em quatro doentes com doença de Crohn (14%). No grupo controlo foram encontradas igualmente duas amostras (6%) reactivas para ANCA. A diferença de distribuição de positivos é significativa entre CU e o grupo controlo ( $\chi^2 = 7,39$ ,  $p = 0,007$ ) não se verificando diferenças no grupo DC.

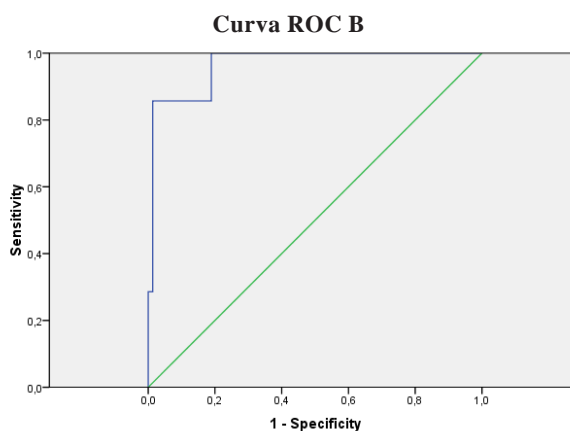


Fig. 1 – Pesquisa dos anticorpos para os *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) em 48 doentes e 33 controlos. Sensibilidade e Especificidade avaliadas por curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) no ensaio imunoenzimático (ELISA) para ASCA-IgG (Fig. A) e ASCA-IgA (Fig. B) relativamente aos resultados obtidos pela imunofluorescência indirecta



Nestas amostras a pesquisa de ANCA foi também realizada por ELISA, tendo sido os resultados obtidos muito discrepantes do método IFA, pelo que se obteve uma concordância fraca ( $k = 0,14$ ). Com o método ELISA (PR3 purificada) foram encontrados três casos positivos referentes a indivíduos com diagnóstico de CU; destes dois apresentavam reactividade em IFA; um indivíduo com diagnóstico DC também apresentou positividade tanto em ELISA como em IFA.

#### Anticorpos anti-ácinos pancreáticos (AP)

A positividade para este marcador foi encontrada em seis das amostras (21,4%) com o diagnóstico de DC, em um com CU (5%) e num controlo, com diferenças de distribuição de positivos significativa entre DC e grupo controlo ( $\chi^2 = 5,04, p = 0,025$ ) não se verificando diferenças no grupo CU.

#### Anticorpos anti-células caliciformes (CCI)

Das amostras de indivíduos com o diagnóstico CU 30% foram positivos para células caliciformes. Na população com diagnóstico de DC quatro amostras foram positivas, bem como em quatro indivíduos (12%) da população controlo, sem diferenças de distribuição de positividade entre grupos ( $\chi^2 = 3,05, p = 0,217$ ).

### DISCUSSÃO

As doenças inflamatórias intestinais têm vindo a assumir uma crescente importância na gastroenterologia, em razão do aumento da sua incidência no mundo, bem como complexidade fisiopatológica, com reflexos na sua terapêutica<sup>1</sup>. Apesar dos avanços no conhecimento da patogénese e das novas terapêuticas imunomoduladoras, o diagnóstico diferencial entre doença de Crohn e Colite Ulcerosa continua a ter como base a clínica e testes invasivos. No entanto, vários estudos têm revelado novos marcadores serológicos promissores para o diagnóstico destas patologias, com destaque para os anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) e anti-citoplasma dos neutrófilos (ANCA)<sup>2</sup>. Também têm merecido atenção os anticorpos anti-células caliciformes intestinais (anti-CCI) e os anti-ácinos pancreáticos (anti-AP)<sup>3</sup>.

Verificámos, de acordo com o descrito na literatura<sup>7-16</sup>, que a positividade do marcador IgG ASCA nas amostras estudadas se associa significativamente ao diagnóstico de DC, quer no método ELISA ( $\chi^2 = 13,454 p = 0,000$ ) quer na IFA ( $\chi^2 = 11,230 p = 0,001$ ), o mesmo acontecendo para os ASCA IgA (dados omitidos). Com o ensaio ELISA ASCA IgA obtivemos uma concordância boa ( $k = 0,56$ ) com o

método IFA (Quadro 1) enquanto que com o ensaio ELISA ASCA IgG verificámos uma concordância excelente ( $k = 0,63$ ).

A detecção dos ASCA ainda não se encontra estandarizada, pelo que os testes podem ter uma *performance* diferente conduzindo a resultados distintos para uma mesma população<sup>6</sup>.

Foi neste sentido que Frank et al compararam diferentes testes ASCA e o seu valor diagnóstico na doença de Crohn<sup>6</sup>. Nesse trabalho, quatro diferentes ensaios ELISA foram analisados quanto à reactividade a ASCA IgA e IgG, comparativamente a um método de imunofluorescência indirecta, da mesma proveniência comercial do que avaliámos. Com o ensaio ELISA ASCA IgA (Inova) Frank et al encontraram uma sensibilidade de 54% e uma especificidade de 93%, com uma concordância com o método IFA excelente ( $k = 0,76$ ), ligeiramente superior ao que obtivemos no nosso estudo. Com ensaio ELISA ASCA IgG encontraram uma sensibilidade de 66%, uma especificidade de 92% e concordância com o método IFA igualmente excelente ( $k = 0,69$ ).

No nosso estudo e com base em curvas ROC (Figura 1), procurámos outros valores de corte que pudessem melhorar a concordância entre o método ELISA, mais automatizável, e o IFA, implementado há mais tempo na avaliação laboratorial da auto-imunidade. Na reactividade à IgG a um valor de corte de 28 U/ml corresponde um aumento da especificidade, comprometendo-se a concordância dado o valor  $k$  baixar para 0,46. Assim parece confirmar-se, na nossa série, o valor de corte referido pelo fabricante. Para os auto-anticorpos IgA, um valor de corte de 190 U/ml aumenta a especificidade (de 88% para 99%) com aumento da concordância com a IFA ( $k$  de 0,56 para 0,86). Com este novo ponto de corte o número de casos discrepantes (ELISA +/IFA -) entre os dois métodos diminuiu de sete para apenas uma amostra (um indivíduo CU). Neste sentido, a implementação futura do ELISA para a pesquisa de ASCA IgA deverá ter em conta um valor de corte superior ao valor de referência proposto (25 U/ml). No entanto, tendo em conta a casuística do nosso estudo ser de pequena dimensão, os valores de corte devem ser *dinâmicos* i.e. recalculados com o aumento do número de amostras.

Por rotina os ANCA são pesquisados em lâminas de neutrófilos fixados pelo etanol e consoante o padrão de fluorescência apresentado são classificados como c-ANCA e p-ANCA. Ao c-ANCA corresponde uma fluorescência granular do citoplasma dos neutrófilos, sendo o principal antigénio alvo a proteinase 3 (PR3). Ao padrão p-ANCA corresponde uma fluorescência linear perinuclear,

sendo o antígeno alvo principal a mieloperoxidase (MPO)<sup>1,3,17,18</sup>; este último padrão de fluorescência é um artefacto causado pela fixação pelo etanol, pois em lâmina com neutrófilos fixados em formol o padrão observado passa a c-ANCA. O padrão p-ANCA, revelado pela imunofluorescência e descrito inicialmente em vasculites primárias, pode ser também encontrado em 40-80% dos indivíduos com CU e em 5-10% dos indivíduos com DC, podendo ser a fluorescência perinuclear menos definida (p-ANCA atípico)<sup>2,11,12,19</sup>.

Segundo Troy et al, os anticorpos responsáveis nestes casos por este padrão de fluorescência não são dirigidos à MPO mas sim a antígeno(s) da superfície interna da membrana nuclear dos neutrófilos<sup>20</sup> que outros autores sugerem ser a Histona H1<sup>8,21</sup>.

Mark Eggena et al, utilizando anticorpos monoclonais anti p-ANCA da CU (Fab 5-3 e 5-2) demonstrou a existência de ligações específicas com essa proteína nuclear (PM = 32-33 KDa), expressa em várias células; essa ligação específica foi confirmada pela ligação a H1 purificada mas não foi significativamente correlacionável com o título p-ANCA ou o estado da doença<sup>21</sup> não parecendo, assim, a especificidade predominante na CU.

Isto pode explicar a fraca concordância ( $k = 0,137$ ) entre os resultados obtidos na nossa casuística por ELISA, onde se utiliza MPO ou PR3 purificadas, e o método IFA, onde a pesquisa é feita no citoplasma de neutrófilos fixados com etanol (i.e. com maior diversidade de auto-antígenos da membrana nuclear). Enquanto o antígeno alvo responsável pelo padrão p-ANCA atípico das DII não for completamente identificado, a sensibilidade e especificidade nos ensaios de fase-sólida disponíveis não parece adequada para o *screening* destes anticorpos<sup>19</sup>.

Individualmente os testes ASCA e p-ANCA atípico parecem ter sensibilidade e especificidade moderadas, não tendo utilidade para monitorização pois os títulos desses anticorpos são relativamente estáveis e não correlacionáveis com a actividade da doença<sup>19</sup>. A pesquisa destes dois marcadores pode ser uma ferramenta para o diagnóstico diferencial, nos casos em que o diagnóstico de DC e CU não podem ser estabelecidos com segurança pelos métodos convencionais (história clínica, radiologia, endoscopia e biopsias)<sup>19</sup>.

O marcador anti-AP pode ser encontrado em cerca de 30 a 40% dos doentes com DC<sup>6</sup>. No nosso estudo, a positividade para este marcador foi em 21,4% das amostras com diagnóstico de DC, 5% das amostras com diagnóstico de CU, mas também num controlo. A associação do marcador anti-AP e os ASCA, que estão descritos como

os mais prevalentes na doença de Crohn (geralmente acima de 65% dos doentes), poderá ajudar na diferenciação entre as duas patologias. Esta associação foi encontrada em apenas 14,3% das nossas amostras com diagnóstico de DC e, globalmente encontramos diferença de distribuição significativa para os anticorpos anti-AP entre os grupos estudados ( $p = 0,039$ ).

Para o marcador serológico anti-CCI, que tem sido associado a 30% dos doentes com CU<sup>6</sup>, a reactividade na nossa série foi de 30% de amostras CU, 14,3% com DC, e em 12% dos controlos. Uma vez que para este marcador não se verificaram diferenças de distribuição da positividade entre grupos pode-se concluir que no nosso estudo este marcador não auxilia na diferenciação das DII.

## CONCLUSÃO

O nosso estudo revelou uma boa concordância entre os métodos de imunofluorescência (IFA) e imunoenzimático (ELISA) na pesquisa de anticorpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) tanto para os anticorpos IgG e IgA, tendo-se verificado uma prevalência de 50 a 60% nas amostras de doença de Crohn. Para os anticorpos do tipo IgA, a especificidade e sensibilidade dos resultados ELISA face à IFA melhoram com valor de corte superior ao de referência. Enquanto o(s) antígeno(s) alvo responsável(is) pelo padrão p-ANCA atípico das DII não forem completamente identificados, a sua pesquisa para o estudo nas DII apenas deve ser efectuado por imunofluorescência indirecta, já que a especificidade dos ensaios ELISA usados não parece adequada para o *screening* destes anticorpos.

Na série que estudámos, a combinação dos anticorpos anti-AP e ASCA é uma boa opção, para o diagnóstico laboratorial da Doença de Crohn. Estes novos marcadores serológicos, tendo o mérito de não serem testes invasivos, apresentam uma sobreposição considerável nas diferentes DII. No entanto, novos estudos prospectivos e em populações mais alargadas, poderão vir a melhor clarificar o valor preditivo destes marcadores serológicos e a sua relação com a resposta terapêutica da Doença Inflamatória Intestinal.

## AGRADECIMENTOS

Os Autores agradecem a Milton Severo, do Serviço de Higiene e Epidemiologia, da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, pela colaboração na avaliação estatística.

Conflito de interesses:

Os autores declaram não ter nenhum conflito de interesses relativamente ao presente artigo.

Fontes de financiamento:

Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo.

## BIBLIOGRAFIA

1. FUNAYAMA BAF, ORSATTI GM, ROBERTO CV: Pesquisa de anticorpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) no soro de doentes com doenças inflamatórias intestinais. *Rev Bras Reumatol* 2001; 41(6):347-353.
2. KASPER DL, BRAUNWOLD E, FAUCI AS, HAUSER SL, LONGO DL, JAMESAM JL: Harrison's – Principles of Internal Medicine. 16 ed. McGraw-Hill Companies, Inc.; 2005; p.1776-1789
3. LEMOS AM, RAMOS MP, FREITAS J et al: Anticorpos Anti-*Saccharomyces cerevisiae* e Anti-citoplasma dos neutrófilos no diagnóstico diferencial da doença inflamatória intestinal. *GE-J Port Gastroenterol* 2002;9:90-6
4. LENNARD-JONES JE: Classification of inflammatory Bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1989;24(suppl):2-6
5. LAWRENCE IC, HALL A, LEONG R, PEARCE C, MURRAY K: A comparative study of goblet cell and pancreatic exocrine autoantibodies combined with ASCA and pANCA in Chinese and Caucasian patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11(10):890-7
6. KLEBL FH, BATAILLE F, HOFSTADTER F, HERFARTH H, SCHOLMERICH J, ROGLER G: Optimising the diagnostic value of Anti-*Saccharomyces cerevisiae*-antibodies (ASCA) in Crohn's disease. *Intl J Colorectal Dis* 2004;19(4):319-324
7. DELGADO L, RAMALHO J: Aspectos imunológicos na etiopatogenia da doença de Crohn. II Parte. *Jornal do Médico* 1983;CXI(2018):314-320
8. JASKOWSKI TD, LITWIN CM, HILL HR: Analysis of Serum Antibodies in Patients Suspected of Having Inflammatory Bowel Disease. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13(6):655-660
9. QUINTON J-F, SENDID B, REUMAUX D et al: Anti-*Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut* 1998;42:788-791
10. BARTA Z, PÕ IC, SZABÓ GG, SZEGEDI GA: Seroreactivity against *Saccharomyces cerevisiae* in patients With Crohn's disease and celiac disease. *World J Gastroenterol* 2003;9(10):2308-12
11. REESE GE, CONSTANTINIDES VA, COSNSTANTINES S et al: Diagnostic Precision of Anti-*Saccharomyces cerevisiae* Antibodies and Perinuclear Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies in Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1-13
12. MARC P, ESSENS SJA, VERMEIRE S, VLIETINCKI R, BOSSUYT X, RUTGEERTS P: Diagnostic Value of Anti-*Sacharomyces cerevisiae* and Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies in Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96(3):730-4
13. COHAVY O, HARTH G, HORWITZ M et al: Identification of a Novel Mycobacterial Histone H1 Homologue (HupB) as an Antigenic Target of pANCA Monoclonal Antibody and Serum Immunoglobulin A from Patients with Crohn's Disease. *Infect Immunity* 1999;67(12):6510-7
14. FELLER M, HUWILER K, STEPHAN R et al: Mycobacterium avium Subspecies paratuberculosis and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007;7(9): 607-613
15. COHEN J: A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychiatr Meas* 1960;20:37-46
16. BOEDEKER EC: Gut microbes, the innate immune system and inflammatory bowel disease: location, location, location. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23(1):13
17. SCHEINBERG MA, MACIEL SB: ANCA-associated vasculitis. *Rev Brás Reumatol* 1999;39(6)
18. MAGRO F, BODAS A, RAMOS JP, VAZ C, TORRINHA F, TAVARELA VELOSO F: Valor dos autoanticorpos anticitoplasma dos neutrófilos com padrão perinuclear (ANCAp) na doença inflamatória do intestino (DII). *GE-J Port Gastroenterol* 1955; 2(Supl):7
19. PAPP M, NORMAN GL, ALTORAY I, LAKATOS PL: Utility of serological markers in inflammatory bowel diseases: Gadget or magic? *World J Gastroenterol* 2007;13(14):2028-36
20. TERJUNG B, SPENGLER U, SAUERBRUCH T, WORMAN HJ: «Atypical p-ANCA» in IBD and hepatobiliary disorders react with a 50-kilodalton nuclear envelope protein of neutrophils and myeloid cell lines. *Gastroenterology* 2000;119:310-322
21. EGGENA M, COHAVY O, PARSEGHIAN MH et al: Identification of Histone H1 as a Cognate Antigen of the Ulcerative Colitis-associated Marker Antibody pANCA *J Autoimmun* 2000; 14(1):83-97